

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 14, 1976, pp. 253–259

Auswertung radioimmunochemischer Bestimmungsmethoden durch „Spline-Approximation“*)

Von H. Nolte, A. v. z. Mühlen und R. D. Hesch

Unter Mitarbeit von J. Pape, U. Warnecke und H. Jüppner

Abteilung für Klinische Endokrinologie, Department für Innere Medizin, Medizinische Hochschule Hannover,
Arbeitsgruppe Endokrinologie, Medizinische Universitätsklinik Göttingen

(Eingegangen am 25. April/19. August 1975)

Zusammenfassung: Es wird über ein vereinfachtes Verfahren zur Berechnung von Standardkurven radioimmunchemischer Bestimmungen berichtet. Dabei gelangt die „spline-Approximation“ zur Anwendung. Mit dem neuen Verfahren ist es gelungen, diese mathematische Funktion auf einem Kleinrechner zu bearbeiten, womit sie einem weiteren Anwenderkreis zur Verfügung steht. Es konnte gezeigt werden, daß gegenüber herkömmlichen Verfahren eine optimale Qualitätssicherung bei der Aufstellung der Standardkurve und der Interpolation unbekannter Plasmaproben erreicht werden kann. Bei der Rückrechnung interpolierter Werte an ihrer eigenen Standardkurve ergab sich ein Fehler von 4,9%, womit die Güte der Interpolation belegt ist. An 8 verschiedenen radioimmunchemischen Bestimmungsmethoden wurde das neuere Verfahren zwei herkömmlichen Verfahren gegenüber gestellt. Es erfolgt eine Wichtung der Meßwerte der Standardkurve sowie eine Qualitätssicherung dieser Werte, die in ihrer mathematischen Auslegung richtiger erscheint, als die anderer Modelle (Ekins et al. sowie Yalow et al. (1968), in: Radioisotopes in Medicine: in vitro studies (Hayes, R. L., Goswitz, F. A. & Murphy, B. E. S., eds.) US AEC, Oak Ridge) und Rodbard et al. ((1971), in: Competitive Protein Binding Assays (Odell, W. D. & Danghedy, W. H., eds.) Lipincott, Philadelphia und Toronto). Gegenüber diesen Modellen erfordert das beschriebene Verfahren keine mathematischen oder kinetischen Voraussetzungen an die Dosiswirkreaktion. Zur Erarbeitung optimaler Versuchsbedingungen wird experimentell erarbeiteten Reaktionsdaten gegenüber Modelltheorien der Vorzug gegeben.

Calculation of radioimmunochemical determinations by "spline approximation"

Summary: A simplified method, based on the "spline approximation", is reported for the calculation of the standard curves of radioimmunochemical determinations. It is possible to manipulate the mathematical function with a pocket calculator, thus making it available for a large number of users. It was shown that, in contrast to the usual procedures, it is possible to achieve optimal quality control in the preparation of the standard curves and in the interpolation of unknown plasma samples. The recalculation of interpolated values from their own standard curve revealed an error of 4.9% which would normally be an error of interpolation. The new method was compared with two established methods for 8 different radioimmunochemical determinations. The measured values of the standard curve showed a weighting, and there was a resulting quality control of these values, which, according to their statistical evaluation, were more accurate than those of other models (Ekins et al., Yalow et al., (1968), in: Radioisotopes in Medicine: in vitro studies (Hayes, R. L., Goswitz, F. A. & Murphy, B. E. P., eds) USA EC, Oak Ridge) and Rodbard et al. (1971), in: Competitive Protein Binding Assays (Odell, W. D. & Danghedy, W. H., eds.) Lipincott, Philadelphia and Toronto). In contrast with these other models, the described method makes no mathematical or kinetic preconditions with respect to the dose-response relationship. To achieve optimal reaction conditions, experimentally determined reaction data are preferable to model theories.

Einleitung

Bisher bekannte Methoden zur Durchführung und Auswertung von radioimmunchemischen Bestimmungen erfüllen Anforderungen, die an eine optimale Interpretation der Reaktionsteilnehmer und der Meßdaten gestellt werden müssen, teilweise nicht:

- a) Eindeutige experimentelle Sicherung mathematisch-theoretischer Modelle zur Bearbeitung des Reaktionsprinzips des Radioimmunoassays.

*) Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (He 593/5).

- b) Errechnung einer Standardkurve mit einer vernünftigen Wichtung der Meßwerte und Elimination von technischen Fehlern.
- c) Ausreichende Qualitätskontrolle der ermittelten Eichkurve und der daran abgelesenen Werte unbekannter Proben.
- d) Rationeller Einsatz von Kleinrechnern.

Mathematisch anspruchsvollere Auswerteverfahren machten meist Großrechner notwendig und waren methodisch aufwendig. Darüber hinaus sind sie teilweise theoretisch anfechtbar (1, 2, 3). Im folgenden wird ein integrierendes Programm zur Anwendung auf Kleinrechnern vorgestellt, unter Anwendung der „Spline-Approximation“ (4, 5).

Theorie der „Spline-Funktionen“

Durch „Spline-Funktionen“ (4) wird ein Meßkollektiv durch eine möglichst glatte Kurve g dargestellt, welche einigen Nebenbedingungen unterliegt. Im folgenden seien x_0, \dots, x_n die Standardkonzentrationen, y_0, \dots, y_n die zugehörigen Meßwerte einer Meßreihe und z_0, \dots, z_n die entsprechende Wichtung der Meßwerte.

$f_i : D \subset \mathbb{R}; (i = 1, \dots, n+1)$ seien Polynome 3. Grades mit

$$D_i = \{a \in \mathbb{R} \mid x_{i-1} \leq a < x_i\} \text{ für } (i = 1, \dots, n)$$

$$D_{n+1} = \{x_n\}$$

Durch diese Polynome f_i definiere man dann eine Funktion

$$g: [x_0, \dots, x_n] \rightarrow \mathbb{R}$$

$$\text{mit } g(a) = \begin{cases} f_1(a) & a \in D_1 \\ \vdots & \\ f_{n+1}(a) & a \in D_{n+1} \end{cases}$$

Man fordert nun:

1. g soll in $[x_0, x_n]$ zweimal stetig differenzierbar sein, also: $g \in C^2([x_0, x_n])$
2. $\int_{x_0}^{x_n} (g''(x))^2 dx = \text{minimal}$

Diese Eigenschaften werden zu einer möglichst glatten Kurve führen.

$$3. \sum_{i=0}^n \left(\frac{y_i - g(x_i)}{z_i} \right)^2 \leq s, \text{ wobei } s \text{ ein frei zu wählender}$$

Parameter ist, der den Grad der Glättung der Kurve g kontrolliert. Er heißt „Glättungsfaktor“ (Smoothing-factor). Diese Nebenbedingung ist unbedingt erforderlich, da sie garantiert, daß g unter Berücksichtigung einer bestimmten Wichtung die Meßreihe darstellt. Das mathematische Problem wird mit den üblichen Methoden der Variationsrechnung (Lagrange-Parameter und Euler-Lagrange-Gleichung) gelöst (6).

Die Wichtung der Meßwerte

Wie die an g gestellten Nebenbedingungen beweisen, ist die Wichtung der Meßwerte von großer Bedeutung für die sinnvolle Approximation der Standardkurve durch die Meßwerte. Bisher war es üblich, als Wichtung die Stan-

dardabweichung der Meßwerte y_i zu wählen. Diese Methode scheint uns mit einem Mangel behaftet. Da nur selten mehr als Dreifachbestimmungen vorliegen, ist die Standardabweichung der Messung von relativ geringer statistischer Aussagekraft. Als sinnvoller erweist sich, mit dem statistischen Zählfehler zu wichten, durch den jede Messung behaftet ist. Wir haben uns daher für folgende Methode entschieden:

Zunächst werden die Dreifach- oder Zweifachwerte der Bestimmung daraufhin untersucht, ob sie innerhalb bestimmter Fehlergrenzen liegen. Als Fehlergrenzen dienen: Der statistische Zählfehler plus eines vom Benutzer bestimmten experimentellen Fehlers. Dieser experimentelle Fehler schließt folgende Fehler implizit ein: Fehler a) beim Pipettieren des markierten Hormons, b) beim Pipettieren des Antikörpers, c) beim Pipettieren von Standard und Plasmaproben sowie d) beim Pipettieren von Puffer. Ungünstige Versuchsbedingungen werden meistens nicht berücksichtigt, einschließlich einer ungenügenden Trennung von gebundenem und freiem Hormon. Diese müßten auf Grund vernünftiger theoretischer Vorüberlegungen und experimenteller Erarbeitung optimaler Assaybedingungen vermieden werden. Die Standardabweichung der Messung wird nun mit diesem Fehler verglichen. Ist sie zu groß, wird ggf. ein stark abweichender Wert aussortiert und der Mittelwert korrigiert. Nun wird der korrigierte Mittelwert der Rechnung zugrunde gelegt und als Wichtung dient das Maximum der ursprünglichen Standardabweichung sowie des statistischen Zählfehlers. Je größer nun der Wert der entsprechenden Wichtung z_i ist, desto größer kann g vom korrigierten Mittelwert y_i abweichen, denn der Quotient

$$\frac{y_i - g(x_i)}{z_i} \text{ bleibt bei großem } z_i \text{ trotzdem relativ klein.}$$

Wahl des Glättungsfaktors

Ein weiteres, wesentliches Kriterium für die Güte der „Spline-Approximation“ ist die Wahl des Glättungsfaktors s . s wird von der Anzahl der Standardpunkte, deren Wichtung, der Meßgenauigkeit und dem formalen Verlauf der Kurve abhängen. Über die letzten beiden Bedingungen läßt sich keine Aussage machen, so daß eine feste Wahl von s a priori sehr problematisch ist. Bei kleiner Flexion der Kurve muß s im allgemeinen kleiner gewählt werden als bei größerer Flexion, da sonst die Kurve in eine Gerade deformiert werden kann, was besonders bei geringer Meßgenauigkeit möglich ist. Es wurde daher eine Methodik entwickelt, um den Glättungsfaktor automatisch zu optimieren. Da Standardkurven von radioimmunochemischen Bestimmungsmethoden im wesentlichen Hyperbel- oder Sigmaform aufweisen, wurden zwei Bedingungen an die Kurve g gestellt:

1. g sollte injektiv sein, d. h. relative Extrema sollen nicht existieren. Diese Forderung ist allgemein für Standardkurven sinnvoll, da Injektivität Voraussetzung für eindeutige Interpolation ist.
2. g sollte maximal 1 Wendepunkt aufweisen (d. h. 0 oder 1 Wendepunkt), anderenfalls weicht g von der Hyperbel- oder Sigmaform ab.

Automatisch setzen wir nun zunächst $s = (\text{Anzahl der Standardmeßpunkte} - 1) : 4$ und errechnen mit diesem Glättungsfaktor die Kurve g . Anschließend untersuchen wir g auf Injektivität und die Form. Entsprechen beide Untersuchungen den Bedingungen

in 1. und 2., wird diese errechnete Standardkurve g als endgültig angesehen, anderenfalls wird s automatisch verdoppelt und das Verfahren wiederholt bis zu maximal 5 Durchgängen. Dadurch wird eine glatte Kurve ausgedruckt, die möglichst wenig über die tatsächlichen Meßwerte hinaus deformiert wird. Falls nach 5 Durchgängen keine Sigma- oder Hyperbelkurve erstellt wurde, so wird das Rechnerprogramm mit der im letzten Durchlauf ermittelten Kurve linear fortgesetzt. Es besteht dann prinzipiell auch die Möglichkeit mit fest vorgegebenem Glättungsfaktor zu wiederholen, ohne daß dann die Bedingungen 1. und 2. beachtet werden.

Qualitätsparameter

- Zunächst wird der Glättungsfaktor, welcher der ermittelten Standardkurve g zugrundeliegt, angegeben. Je kleiner s ist, desto weniger wird g von den tatsächlichen Meßwerten y_i abweichen.
- Anschließend wird folgender Quotient q berechnet:

$$q = \frac{\sum_{i=0}^n (y_i - g(x_i))^2}{\sum_{i=0}^n z_i^2} = \frac{\Sigma(SK)}{\Sigma(SD)} \geq 1$$

$\Sigma(SK)$ bedeutet Summe der Kurvenabweichungsquadrate (D)
 $\Sigma(SD)$ bedeutet Summe der Standardabweichungsquadrate (AD)

$\Sigma(SK)$ muß kleiner als $\Sigma(SD)$ sein, d. h. der Quotient sollte kleiner als 1 sein. Ist er größer als 1 oder doch nicht wesentlich kleiner als 1, so wird die Kurve häufig außerhalb der Fehlergrenzen der tatsächlichen Meßwerte verlaufen. Der optimale Wert für q ist nahe 0.

- Die Anzahl der Extrema wird ermittelt. Diese sollte 0 sein, da sonst eine eindeutige Interpolation nicht möglich ist.
- Die Anzahl der Wendepunkte soll nicht größer als 1 sein, da sonst keine Hyperbel- oder Sigmakurve erstellt werden kann.

Beschreibung der Rechanlage und des Programms

Das erstellte Programm wird mit einer Diehl-Alphatronic 322 mit erweiterter Speicherkapazität und Magnetkassette bearbeitet. Die Kurve g wird durch einen Diehl-Plotter ausgedruckt. Wahlweise kann auch mit einer Schreibmaschine als Ausgabeeinheit gearbeitet werden. Das System kann on-line oder unter Zwischenschaltung eines Lochstreifenlesers off-line benutzt werden. Die vorgestellten Daten wurden im on-line-Betrieb (gekoppelt an einen Gamma-Zähler BF 5300, Berthold) bearbeitet. Die Mittelwerte sämtlicher Meßdaten werden korrigiert, und nach Übermittlung der Standardkurven-Werte wird die „Spline-Approximation“ durchgeführt. Anschließend werden die Kontrollparameter ausgedruckt, die Meßwerte mit statistischen Abweichungen in ein Koordinatensystem gedruckt und die Kurve automatisch eingezeichnet (Abb. 1). Anschließend werden die abzulesenden Bestimmungswerte angenommen, und nachdem ihr korrigierter Mittelwert errechnet wurde, wird mittels Iteration an der Standardkurve g interpoliert.

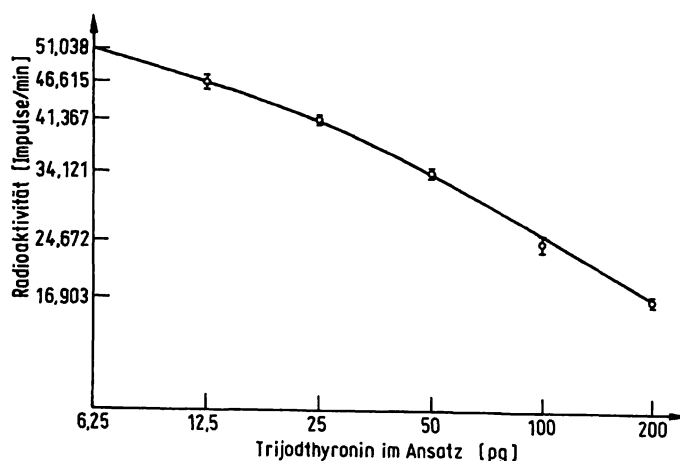


Abb. 1. Direkter on-line-Ausdruck einer durch Spline-Approximation gewonnenen Standardkurve für Trijodthyronin. Im Computer-Programm direkt ausgedruckte Qualitätsparameter zur Beschreibung der Zuverlässigkeit und Präzision der Standardkurve:

- $S = 1,5$ ("Smoothing-Faktor" (Glättungsfaktor))
- $0 = 0,000$ (Anzahl der Extrema)
- $\#0 = 1,000$ (Anzahl der Wendepunkte)
- $AD = 30,90912$ (Summe der Standardabweichungsquadrate)
- $D = 11,03213$ (Summe der Kurvenabweichungsquadrate (Wichtungsquadrate))
- $PC = 1,93\%$ (unspezifische Bindung)
- $\#* = 1,86 \left(\frac{B}{F}\right)_0$ (0-Bindung ohne Zusatz von Antikörper)
- $LD = 6,25$ pg/Ansatz (Untere Nachweisgrenze)

Bedienung des Rechners

Folgende Informationswerte werden auf der Bandkassette u. U. abweichend für jede radioimmunochemische Bestimmungsmethode getrennt angegeben:

- Anzahl der Standardmeßwerte
- Anzahl der Gesamtproben
- Standardkonzentrationen in steigender Reihenfolge
- Vielfachheit der Standardmeßwerte
- Vielfachheit der Bestimmungswerte
- Art der Dateneingabe (manuelle Eingabe, on-line-Eingabe, Lochstreifeneingabe)
- Zeichnung mit Plotter
- Grenze des Pipettierfehlers in (%)
- Wahl des Glättungsfaktors (manuell oder optimiert)
- Einteilung der x-Achse (linear oder logarithmisch)
- Umrechnungsfaktoren für die interpolierten Werte
- Messung des freien markierten Hormons oder des gebundenen markierten Hormons.

Diese Reihe der Informationsparameter ist für jeden Assay unter einer Code-Nummer fest gespeichert und durch Eingabe der Code-Nummer abrufbar.

Zeitaufwand und Berechnung

Die Berechnung der Standardkurve g dauert etwa 8 Minuten, während die Interpolation eines Meßwertes ungefähr 15 Sekunden in Anspruch nimmt. Ein Assay mit 8 Standardmeßpunkten und 50 Bestimmungspunkten (Dreifachbestimmung) kann im allgemeinen in ungefähr 20 Minuten bearbeitet werden. Dieser Zeitaufwand wird durch die Meßzeit im on-line-Betrieb stark relativiert. Zur opti-

malen Ausnutzung der Rechenanlage bei Betrieb mit mehreren Zählgeräten für Radioaktivität ist daher die Dateneingabe mittels Lochstreifen sinnvoller.

Vergleich der Auswertung von verschiedenen radioimmunchemischer Bestimmungsmethoden mittels verschiedener Methoden

Um die Wertigkeit der verschiedenen Methoden zu überprüfen, haben wir zwei häufig angewendete Methoden der statistischen Bearbeitung einer Dosis-Wirkbeziehung,

die „Logit-Transformation“ (3) und die $\frac{Bo}{B}$ -Transformation (7) der „Spline-Approximation“ gegenübergestellt. Mit diesem Verfahren wurden Standardkurven unausgewählter radioimmunologischer Bestimmungsmethoden bearbeitet und die Ergebnisse gegenübergestellt. Das Verfahren wurde auf folgende Radioimmunoassays angewendet:

Thyrotropin, Somatotropin, Lutropin, Parathyrin, Gesamt-Trijodthyronin, freies Trijodthyronin, Gesamt-Thyroxin, Thyroxin-Bindungs-Globulin (TBG) (Tab. 1)

Tab. 1. Auswertung von radioimmunchemischen Meßverfahren in der Schilddrüsendiagnostik. Rückinterpolation von Standardmeßwerten an der mit verschiedenen Verfahren erhaltenen Standardkurven. Angewendet wurden zwei herkömmliche Verfahren (Linearisierung nach $\frac{Bo}{B}$ und Logit-Transformation) und dem Spline-Approximations-Verfahren gegenübergestellt.

Die kursiv gekennzeichneten Werte lagen nicht innerhalb der Fehlergrenze der Methode.

| | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|-------------------------------------|
| Thyrotropin Standards (mE/l) | 1,5 | 3,6 | 6,8 | 25,0 | 50,0 | | | | |
| spline | 1,502 | 3,23 | 6,48 | 25,02 | 49,98 | | | | |
| $\frac{Bo}{B}$ | 4,22 | 4,78 | 5,58 | 12,32 | 56,33 | | | | $a = 0,499, b = -0,81, r = 0,9464$ |
| logit | 1,99 | 3,34 | 5,13 | 17,46 | 76,64 | | | | $a = 1,21, b = 2,01, r = 0,9718$ |
| Trijodthyronin Standards ($\mu\text{g/l}$) | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | 100 | 200 | | | |
| spline | 6,34 | 12,39 | 24,35 | 49,41 | 108,43 | 196,42 | | | |
| $\frac{Bo}{B}$ | 4,54 | 12,78 | 25,15 | 49,88 | 103,48 | 198,30 | | | $a = 0,012, b = 1,004, r = 0,9997$ |
| logit | 5,40 | 14,18 | 26,81 | 50,20 | 100,57 | 188,31 | | | $a = -1,03, b = 4,54, r = -0,9972$ |
| Freies Trijodthyronin Standard (ng/l) | 0,35 | 0,75 | 1,5 | 3,125 | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | |
| spline | 0,35 | 0,82 | 1,45 | 2,84 | 6,34 | 11,16 | 25,45 | 49,049 | |
| $\frac{Bo}{B}$ | 0,41 | 0,71 | 1,14 | 2,42 | 6,41 | 12,54 | 25,8 | 49,6 | $a = 0,07, b = 0,97, r = 0,9996$ |
| logit | 0,28 | 0,89 | 1,46 | 3,10 | 7,40 | 13,31 | 24,58 | 43,12 | $a = -1,17, b = 3,18, r = 0,9968$ |
| Thyroxin Standards ($\mu\text{g/l}$) | 4,5 | 9,5 | 19,0 | 38,0 | 75,0 | 150 | 300 | | |
| spline | 0,46 | 0,80 | 1,909 | 3,78 | 7,50 | 15,04 | 29,06 | | |
| $\frac{Bo}{B}$ | -0,13 | 0,31 | 1,91 | 4,25 | 8,71 | 16,59 | 28,86 | | $a = 0,17, b = 1,16, r = 0,9953$ |
| logit | 0,49 | 0,78 | 1,97 | 3,92 | 7,90 | 19,73 | 28,91 | | $a = -0,87, b = 1,28, r = 0,9979$ |
| Thyroxin bindendes Globulin Standards (ng/Ansatz) | 1,56 | 3,125 | 6,25 | 12,5 | 25 | | | | |
| spline | 1,60 | 2,929 | 6,20 | 12,93 | 24,69 | | | | |
| $\frac{Bo}{B}$ | 1,62 | 2,93 | 6,17 | 12,97 | 24,79 | | | | $a = 0,129, b = 1,01, r = 0,999637$ |
| logit | 1,63 | 2,93 | 6,14 | 12,86 | 25,05 | | | | $a = -0,974, b = 1,97, r = -0,9992$ |

Tab. 2. Auswertung radioimmunochemischer Bestimmungsmethoden von Lutropin und Somatotropin sowie einer immunradio-metrischen Bestimmungsmethode von Parathyrin (sonst siehe Legende Tab. 1).

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------|--------|-------|--------|-------|------------------------------------|------------------------------------|------|------------------------------------|--|
| Lutropin Standards (E/l) | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 4,0 | 8,0 | 16,0 | | | | |
| spline | 0,60 | 0,98 | 2,01 | 4,02 | 8,10 | 16,00 | | | | |
| $\frac{Bo}{B}$ | 0,50 | 0,86 | 1,93 | 4,03 | 7,93 | 16,03 | a = 0,2233, b = 0,957, r = 0,9998 | | | |
| logit | 0,49 | 0,92 | 2,16 | 4,33 | 7,94 | 15,09 | a = - 1,12, b = 1,78, r = - 0,9986 | | | |
| Somatotropin Standards (μ g/l) | 0,5 | 1,25 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | | | | | |
| spline | 0,51 | 1,22 | 2,51 | 5,23 | 9,96 | | | | | |
| $\frac{Bo}{B}$ | 0,58 | 1,15 | 2,22 | 4,79 | 10,18 | a = 0,75, b = 0,76, r = 0,9981 | | | | |
| logit | 0,49 | 1,27 | 2,49 | 5,09 | 9,82 | a = - 1,20, b = 0,74, r = - 0,9999 | | | | |
| Parathyrin Standards (μ g/l) | 0,039 | 0,078 | 0,156 | 0,3125 | 0,625 | 1,25 | 2,5 | 5,0 | | |
| spline | 0,039 | 0,078 | 0,151 | 0,3100 | 0,632 | 1,28 | 2,40 | 5,08 | | |
| $\frac{Bo}{B}$ | - 0,27 | - 0,12 | 0,09 | 0,46 | 1,05 | 1,71 | 2,58 | 4,78 | a = 0,32, b = 1,119, r = 0,9837 | |
| logit | 0,027 | 0,081 | 0,174 | 0,394 | 0,781 | 1,31 | 2,07 | 4,33 | a = - 0,74, b = 0,58, r = - 0,9929 | |

und 2). Bei allen drei Verfahren haben wir die Standardkurve an der ermittelten Standardkurve zurückinterpoliert und untersucht, ob die interpolierten Werte in den Fehlergrenzen der gemessenen Standardwerte lagen. Bei einer idealen Approximation der Standardkurve muß eine minimale Abweichung gefordert werden. Es zeigt sich, daß bei „Spline-Approximation“ 4,9% der rückinterpolierten Werte außerhalb der Fehlergrenzen lagen,

bei dem $\frac{Bo}{B}$ -Verfahren waren es 41,2% und beim „Logit-

Verfahren“ 31,6%. Mit der „Spline-Approximation“ waren alle untersuchten Radioimmunoassays auswertbar, während die „Logit-Methode“ auffallenderweise nicht allgemein anwendbar war. Diese Statistik unterstreicht deutlich den universellen Anwendungsbereich der „Spline-Approximation“. Wesentlich ist, daß das Verfahren keine Anforderungen an die Kurvenform stellt und technische Fehler mit Hilfe der Wichtung relativ weitgehend eliminiert werden können.

Diskussion

Grundsätzlich müssen zwei Gesichtspunkte bei der Etablierung radioimmunochemischer Bestimmungsmethoden beachtet werden:

1. a) Erarbeitung einer universell anwendbaren mathematischen Modell-Theorie zur Beschreibung optimaler Dosis-Wirkverhältnisse.

b) Die mathematische Theorie muß sich entsprechenden experimentellen Erfahrungen in wesentlichen Punkten zuordnen lassen.

2. a) Erarbeitung einer statistischen Methode zur Erstellung von gewichteten Dosis-Wirkkurven und Interpolation von Meßwerten unter optimalen Assaybedingungen.

b) Die statistische Methode muß auf alle experimentellen Dosis-Wirkkurven anwendbar sein.

Die ursprünglich verwendeten Modell-Theorien über den Ablauf radioimmunochemischer Reaktionen basieren auf den grundlegenden Arbeiten von *Ekins et al.* (2) sowie *Yalow & Berson* (1) und werden von diesen herangezogen zur theoretischen Berechnung optimaler Assaykonditionen. Diese Theorien gehen von einigen grundsätzlichen, einfachen Annahmen aus, die bei *Feldman & Rodbard* (8) zusammengefaßt sind. Einige dieser Annahmen werden den tatsächlichen experimentellen Verhältnissen aber nicht gerecht, so daß *Feldman & Rodbard* (8) ein komplizierteres computer-simuliertes „Multi-Component-System“ einführen. Eigene experimentelle und mathematische Untersuchungen führten neuerdings zur Beschreibung von homotropen-kooperativen Effekten bei der radioimmunochemischen Reaktion, die jedoch in keinem der bisherigen theoretischen Modelle berücksichtigt wurden, diese aber erheblich beeinflussen können (*Bartels & Hesch* (9)). Die bisherigen mathematischen Modelle lassen also trotz ihres in-

zwischen äußerst komplexen Aufbaues keine allgemeinverbindliche Beschreibung individueller Assaysysteme zu. Daher müssen unter Einbezug wesentlicher kinetischer-mathematischer Voraussetzungen dieser Modelle trotzdem optimale Assaybedingungen experimentell erarbeitet werden (*Bartels & Hesch* (10)). Dazu sind wenige grundsätzlich allgemeingültige Reaktionsansätze anwendbar. Diese betreffen

- a) die Charakterisierung des markierten Hormons und des Antikörpers durch sog. „Heißkurven“ (10),
- b) das Verhalten des markierten zum unmarkierten Hormon (11),
- c) optimale Äquilibriumbedingungen für markiertes und unmarkiertes Hormon sowie
- d) die Trennungsmethode.

Nach dem Gesagten lassen sich kinetische Dosis-Wirkvariable von *Feldman & Rodbard* (8) mathematisch nicht eindeutig voraussagen. Begriffe wie „slope, intercept, midrange, lambda und least detectable dose“ werden dadurch stark relativiert. Demnach lassen sich auch die statistischen Annahmen von *Rodbard* (3) zur Qualitätsbeschreibung und -sicherung nur einschränkend verwenden, insbesondere unter Berücksichtigung der artifiziellen Annahme des gültigen Modells III nach *Rodbard* (3). Nicht lineare Standardkurven mit uneinheitlicher statistischer Schwankung des Einzelwertes können daher nicht ohne systematischen Zwang über ein Modell, das primär von der Betrachtung der ablaufenden physikochemischen Reaktion ausgeht, errechnet werden. Sinnvoller als eine solche theoretisch-modellhafte Betrachtung ist daher ein Auswertverfahren, das a priori eine heuristische Kurvenbeschreibung selbst anstrebt. Ein solches Interpolationssystem experimenteller Daten wurde 1967 von *Reinsch* (4) beschrieben. Unter Anwendung der „spline-function“ wurde ein Verfahren zur optimalen Glättung einer Kurve von experimentell erhaltenen Punkten beschrieben („smoothing by spline-function“) (5). Das Verfahren wurde 1973 von *Marschner* et al. zur Berechnung radioimmunochemischer Standardkurven mittels Großrechner angegeben (11). Das Verfahren wurde von uns in wesentlichen Punkten modifiziert:

- a) Unter Verwendung eines Tischrechners (Diehl-AlphaTronic) ist die Approximation der Standardkurve und Interpolation von Meßwerten überall und unabhängig von Großrechnern möglich geworden. Rechen- und Speicherkapazität des verwendeten Rechners sowie ähnlicher Systeme sind ausreichend zur Bearbeitung radioimmunochemischer Messung im on-line- oder off-line-Verfahren über Lochstreifen, welches wir zur optimalen Nutzung von Meßgeräten und Rechner bevorzugen.
- b) Die Wichtung der Meßwerte der Standardkurven wird über den statistischen Zählfehler der Impulsrate plus eines vom Benutzer bestimmbar ex-

perimentellen Fehlers bewirkt. Im Rahmen der Qualitätssicherung der Standardkurven und der Meßwerte ist dieses Verfahren in seiner Praktikabilität dem von *Rodbard* (3) überlegen. In dieses Wichtungungsverfahren wurde sinnvollerweise ein sog. „outlier-screening“ eingebaut, d. h. Meßwerte, die außerhalb einer definierten Fehlergrenze liegen, werden aussortiert, womit die Beschreibung der Präzision eines Assay impliziert ist. Automatisch wird die Berechnung der unteren Nachweisgrenze angegeben, („lower limit of detection“), ohne theoretische Anforderungen an das Reaktionssystem.

- c) Die Zuverlässigkeit der erstellten Standardkurve wird ebenfalls beschrieben. Dies erschien uns besonders wichtig. Als Maß hierfür dient der „smoothing-factor“ (5), also der Glättungs-Faktor. Die manuelle Vorwahl (11) schien uns wenig geeignet. Bei streng monotoner s-förmiger oder hyperbelförmiger Kurve kann dies automatisiert werden. Dazu wird die Berechnung von internen Extrema und Wendepunkten der Standardkurve bei kleinem Glättungs-Faktor herangezogen, wobei in der Sigma-Kurve 0-Extrema und ein Wendepunkt, bei Hyperbel 0-Extrema und 0-Wendepunkte gefunden werden müssen. Der Glättungs-Faktor wird so lange verdoppelt, bis diese Bedingungen erfüllt sind. Somit stellt *s* einen eminenten Qualitätsparameter dar, der aus mehreren wesentlichen Anforderungen an die Meßreihe der Standardkurve und deren Verlauf zusammengesetzt ist. Der Glättungsfaktor ist in unserem Verfahren ein wesentlicher Qualitätsparameter geworden.
- d) Nach der automatischen Angabe des Glättungs-Faktors als Qualitätsparameter wird zusätzlich durch die Berechnung des Quotienten *q* eine Qualitätsaussage möglich.

Sämtliche Parameter zur Charakterisierung der Präzision und Zuverlässigkeit der Standardkurve werden automatisch angegeben. Dadurch ist eine optimale Transparenz der Qualitätssicherung unmittelbar ablesbar, was ebenfalls für die Interpolation der Meßwerte zutrifft. Die Standardkurve kann ausgedruckt werden. Unsere Ergebnisse haben eindeutig gezeigt, daß ein heuristisches Verfahren, — die „Spline-Approximation“, — den herkömmlichen Methoden, ausgehend von der modelltheoretischen Betrachtung radioimmunochemischer Reaktionen, an Richtigkeit überlegen ist. Das Verfahren läßt eine qualitätsoptimierte Ablesung der Meßwerte zu. Dies kann wichtige Konsequenzen für Meßangaben in der Literatur haben.

Zur Erarbeitung optimaler Versuchsbedingungen geben wir experimentell erarbeiteten Reaktionsdaten auf der Grundlage einfacher theoretischer Überlegungen den Vorzug. Zur Auswertung von Dosis-Wirkvariablen ist eine reine Formbeschreibung durch „Spline-Approximation“ optimal.

Anmerkung

Das hier vorgestellte Programm für die maschinelle Kombination eines Gamma-Zähler BF 5300, Berthold mit einer Rechenmaschine Diehl-Alphatron 322 ist über die BF-Vertriebsgesellschaft Hannover erhältlich.

Danksagung

Fräulein E. Ryssel danken wir für sorgfältige Vorbereitung des Manuskripts.

Literatur

1. Ekins, R. P., Newman, G. B. & O'Riordan, J. L. H. (1968), in: *Radioisotopes in Medicine: In vitro studies*, (Hayes, R. L., Goswitz, F. A., Murphy, B. E. P. eds.) US Atomic Energy Commission, Oak Ridge, 59.
2. Yalow, R. S., Berson, S. A. (1968), in l. c. (1), 7.
3. Rodbard, D. (1971), in: *Competitive protein binding assays* (Odell, W. D. & Danghedy, W. H., eds) Lipincott, Philadelphia and Toronto, 204–259.
4. Reinsch, C. H. (1967), *Numer. Math.* 10, 177–183.
5. Reinsch, C. H. (1971), *Numer. Math.* 16, 451–454.
6. Funk, P. (1962), *Variationsrechnung und ihre Anwendung in Physik und Technik*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
7. Hales, C. N. & Randle, P. J. (1963), *Biochem. J.* 88, 137.
8. Feldman, H. & Rodbard, D. (1971), in: *Competitive protein binding assays* (Odell, W. D. & Danghedy, W. H., eds) Lipincott, Philadelphia and Toronto, 158–203.
9. Bartels, H. J. & Hesch, R.-D. (1973), *diese Z.* 11, 311–318.
10. Bartels, H. J. & Hesch, R.-D. (1972), *diese Z.* 10, 351–354.
11. Hunter, W. M. (1971), in: *Radioimmunoassay Methods*, (Kirkham, K. E. & Hunter, W. M. eds) Churchill Livingstone, 3–23.
12. Marschner, J., Erhardt, F. & Scriba, P. C. (1973), in: *IAEA Symposium on radioimmunoassay and related procedures in clinical medicine and research*, Istanbul (abstract).

Priv. Doz. Dr. Rolf-Dieter Hesch
Medizinische Hochschule
Dept. Innere Medizin
Abteilung für Klinische Endokrinologie
Karl-Wiechert-Allee 9
D-3000 Hannover 61

